

## چکیده

محصولات دارویی نو ترکیب، محصولاتی هستند که به کمک دانش بیوتکنولوژی تولید می شوند و شامل ترکیباتی همچون پروتئینها، اسیدهای نوکلئیک، ویروسها و باکتریهای با اثرات سمی کاهش یافته می باشد که جهت مقاصد درمانی یا تشخیصی بکار می روند. قسمت اعظم فرآورده های دارویی زیستی از نمونه های زنده مانند میکروارگانیسم ها، رده های سلولی پستانداران و یا کشت های سلولی گیاهی بدست می آیند. باکتری گرم منفی E.coli یکی از بهترین میزبانها جهت تولید محصولات دارویی می باشد، زیرا از نظر ژنتیکی کاملاً شناخته شده است و قدرت رشد سدیم در محیطهای ارزان را دارد. انواع محصولات دارویی میزبان E.coli تولید می شوند که از جمله ی آنها می توان به استرپتوکیناز و اینترفرون اشاره کرد. استرپتوکیناز پروتئینی است که به پلاسمینوژن انسانی متصل شده و آنرا فعال می کند. این دارو برای حل کردن فیبرین در لخته های خون در حملات قلبی و آمبولی های ریوی بکار می رود. اینترفرون ها پروتئین هایی هستند که سلول های میزبان در پاسخ به تهاجم عوامل بیماریزا مانند ویروسها یا باکتری ها، ترشح می کنند و موجب تحریک سیستم ایمنی و افزایش مقاومت بدن می شوند. اینترفرون ها از دسته سایتوکاین ها هستند. ضمن تولید استرپتوکیناز یا اینترفرون در سلول E.coli و در حین استخراج آنها از سلول میزبان، قطعاتی از DNA ژنومی میزبان E.coli به همراه محصولات خارج می شود. اگرچه اهمیت حضور آلودگی های DNA در محصولات دارویی، بخوبی شناخته نشده است، لیکن این امکان وجود دارد که این قطعات بتوانند وارد سیستم ژنتیکی دریافت کنندگان دارو شوند و باعث ایجاد عوارض بالینی شوند. میزان قابل قبول آلودگی DNA در محصولات دارویی، از نظر سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) حدود ۱۰۰ پیکوگرم در هر دوز محصول، و از نظر سازمان بهداشت جهانی (WHO) و اتحادیه ی اروپا (EU) تا حدود ۱۰ نانوگرم در هر دوز محصول، بلامانع می باشد.

**روشها:** جهت تعیین میزان آلودگی DNA در محصولات دارویی از تکنیک Real time PCR استفاده می شود. برای این منظور، ابتدا سویه W<sup>3110</sup> از سلول E.coli که میزبان تولید محصولات نوترکیب است، در محیط LB broth کشت داده می شود. سپس DNA ژنومی سلول میزبان، استخراج شده و غلظت آن سنجیده می شود. پرایمرهای مناسب جهت تکثیر نواحی حفاظت شده ی 5S , 23S , 16S rRNA طراحی شده و واکنش زنجیره ای پلیمرز با شیب دمایی (Gradient PCR) جهت تکثیر DNA ژنومی توسط پرایمرهای طراحی شده، انجام می پذیرد تا دمای مطلوب اتصال (Annealing temperature)، مشخص شود. سپس مخلوط واکنش (Master mix) توسط آنزیم DNase به مدت یک ساعت تحت تیمار قرار می گیرد تا از عدم حضور آلودگی احتمالی DNA در مواد اولیه ی واکنش، اطمینان حاصل شود. اکنون به رقت های متوالی DNA ژنومی باکتری میزبان، از غلظت ۱۰ نانوگرم تا غلظت ۰.۸ پیکوگرم تهیه می شود. واکنش Real time PCR جهت تکثیر DNA به کمک سایرگرین انجام شده و منحنی استاندارد، رسم می شود. سپس استرپتوکیناز و اینترفرون از نظر احتمال حضور آلودگی DNA و اندازه گیری میزان آلودگی، توسط تکنیک Real time PCR مورد بررسی و کمیت سنجی قرار می گیرند. در پایان، دو جفت پروب TaqMan جهت اتصال اختصاصی به توالی حفاظت شده ی 16S rRNA طراحی می شود و واکنش Real time PCR جهت تکثیر اختصاصی توالی مورد نظر انجام می شود.

**نتایج:** دمای مناسب جهت اتصال پرایمر به الگو (Annealing Temperature)، ۶۰ درجه می باشد. در بین پرایمرهای طراحی شده، جفت پرایمرهای 16S<sub>۱</sub> , 16S<sub>۲</sub> از نظر پرایمردایمر و اتصال اختصاصی، بهتر از سایر پرایمرهای دیگر عمل کردند. در تهیه ی رقت های متوالی DNA ژنومی و رقیق کردن آنها به کمک محلول فسفات بافرسالین (PBS) که حاوی سرم آلبومین گاوی (BSA) بود، تکثیر

قطعات DNA بخوبی صورت گرفت. در بررسی تکثیر DNA ژنومی به کمک سایبرگرین، با استفاده از عناصر دارویی فعال (API) استرپتوکیناز و اینترفرون، حضور آلودگی DNA مورد بررسی قرار گرفت. میزان آلودگی DNA موجود در محصولات دارویی استرپتوکیناز و اینترفرون، در حد کمتر از میزان مجاز بیان شده توسط سازمان بهداشت جهانی (WHO) و سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) گزارش شدند. در تکثیر اختصاصی قطعات DNA به کمک پروب های TaqMan، در حضور هر دو پروب  $^{16}S_1$  ,  $^{16}S_2$  ، پروب  $^{16}S_1$  کارایی بهتری از خود نشان داد.

**بحث:** باکتری E.coli مدت زیادی است که بعنوان یک سیستم میزبانی جهت تولید انبوه پروتئین های نو ترکیب، بکار رفته است. باقی ماندن DNA هنگام حذف آلودگی ها در مرحله ی پالایش در فرآورده های نهایی، بزرگترین نگرانی در فرآیند تولید، محسوب می شود. در این مطالعه، روش حساس و دقیق Real time PCR جهت تشخیص آلودگی های DNA ژنومی E.coli بعنوان سلول میزبان، در محصولات دارویی، بکار رفته است.



دانشگاه علوم پزشکی قزوین

پایان نامه کارشناسی ارشد زیست فناوری پزشکی (M.Sc)

موضوع

راه اندازی تکنیک Real-time PCR جهت تشخیص ناخالصی DNA ژنومی E.coli

در محصولات نو ترکیب

استادان راهنما

دکتر تقی ناصرپور فریور – دکتر محسن کریمی ارزنانی

استادان مشاور

دکتر محمد عزیزی-مهندس امیر جوادی

نگارش:

بابک ممنون

سال تحصیلی ۹۱-۹۰